

万年青 *Ls-rRNA* 5' 端核苷酸序列及进化意义*

屈良饒** 余小强

(中山大学生物工程研究中心, 广州 510275)

洪德元 鲁迎青

(中国科学院植物研究所系统与进化植物学开放研究实验室, 北京 100093)

Ls-rRNA 5' NUCLEOTIDE SEQUENCE OF *ROHDEA JAPONICA* (LILIACEAE) AND ITS EVOLUTIONARY SIGNIFICANCE

QU LIANG-HU YU XIAO-QIANG

(Biotechnology Research Centre, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

HONG DE-YUAN LU YING-QING

(Laboratory of Systematic and Evolutionary Botany, and Herbarium, Institute of Botany,
Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093)

Abstract The sequence of *Ls-rRNA* 5' terminal 347 nucleotides of *Rohdea japonica* (Thunb.) Roth has been precisely determined. A phylogenetic tree constructed based on the rRNA nucleotide sequences of this and five other angiosperm species and an algal species (*Porphyridium purpureum*) is in accordance with the taxonomical system generally accepted. The result indicates that this method is of a high resolution for revealing differences and relationships among families and genera. It is also shown by our result that the difference between *Rohdea* and the *Poaceae* is greater than that between the *Solanaceae* and the *Brassicaceae*. Therefore, it may be considered that the divergence between these two groups took place at early stage of evolution of monocotyledons.

Key words *Rohdea japonica* (Thunb.) Roth; rRNA; nucleotide sequence; systematics

摘要 本工作准确测定了万年青 *Rohdea japonica* (Thunb.) Roth *Ls-rRNA* 5' 端 347 个核苷酸序列。以该序列与其他五种被子植物及一种红藻已发表的序列为基础构造的系统树与一般所接受的植物分类系统十分吻合,而且说明这一方法对被子植物不同科、属之间的差异有良好的分辨率。我们的分析结果还表明,万年青与禾本科之间的差异很大,它们的分歧可能发生在单子叶植物起源的早期。

关键词 万年青; rRNA; 核苷酸序列; 系统学

* 中国科学院植物研究所系统与进化植物学开放研究实验室和国家自然科学基金资助项目。

** 中国科学院植物研究所系统与进化植物学开放研究实验室客座研究员。

1990.05.06 收稿。

被子植物是地球上现存最大的植物类群,与人类的关系也最为密切。一百多年来,植物学家从不同学科出发对这一类群已作了大量研究,但是还有许多重要的问题迄今还没有得到满意的解释,特别是关于被子植物的起源和系统发育,还存在着许多争论。缺乏充分的化石证据是一个重要原因。被称为生物体内“活化石”的核苷酸序列为研究生命的历史提供了一个非常有用的分子生物学工具。核糖体核糖核酸(rRNA)由于结构相对保守,并存在于所有的生命细胞中,现已被广泛应用于生物的系统与进化研究中作为分子指标(Pace et al. 1986)。但是,对于在被子植物起源及进化中具有重要地位的类群,如百合科,迄今尚未有其 rRNA 序列的研究报道。本文报道了我们采用大分子 rRNA 直接序列分析法,对百合科植物——万年青(*Rohdea japonica*)的核编码核糖体大亚基 RNA(Ls-rRNA)序列分析的结果,并且对 Ls-rRNA 5' 端能否作为研究植物系统与进化的分子指标进行了讨论。

材 料 与 方 法

1. 万年青大分子 RNA 的提取: 摘取万年青(*R. japonica*)新鲜嫩叶,立即放入液氮中,待充分冷冻后取出,用乳钵研磨成粉末,加入含有 3mol/L LiCl 及 6mol/L 尿素的缓冲液(Auffray and Rougeon 1980),在高速匀浆器上破碎 5 分钟。放置于 4℃ 10 小时左右,以 15000 转高速离心 15 分钟后,去掉上清液,以适当缓冲溶液溶解沉淀的大分子 RNA,用酚-氯仿(1:1)抽提两次,以乙醚洗涤后,用 3 倍乙醇沉淀大分子 RNA。

2. Ls-rRNA 的快速序列测定: 测序引物 D_{1a}, D_{1b} 和 D_{1c} 分别对应于 Ls-rRNA 的进化保守片断(84-106, 278-302, 382-404 按小白鼠 28 S rRNA 序列编号)。序列测定基本上按照我们过去的方法进行(Qu et al. 1983, 1988),即以逆转录酶延伸与 Ls-rRNA 专一性杂交的引物(引物的 5' 端用磷-32 放射性同位素标记),在双脱氧核糖核苷酸存在下进行测序反应,然后电泳,放射性自显影。

3. rRNA 序列比较及树系图的绘制: 将各个序列按最大同源性的原则进行排列,并两两比较得到不同物种间的核苷酸差异数(凡有缺失的位点均未计算在内)。用 Kimura (1980) 公式将核苷酸差异进行校正得到 Knuc 值。采用简单的聚类法(UPGMA)构建树系图(Sneath and Sokal 1973)。

结 果

1. *Rohdea japonica* Ls-rRNA 5' 端 347 个核苷酸已被准确测定(见图 1)。我们将该

图 1 万年青(*Rohdea japonica*) Ls-rRNA 5' 端的核苷酸序列与来自其它被子植物(Qu et al. 1988; Kiss et al. 1989)和一种红藻(Perasso et al. 1989)的同源序列的排列比较。排列中仅标明与 *R. japonica* 不同的核苷酸,而相同的核苷酸则以短划代表。星号表示缺失;X 代表未测出的核苷酸。

Fig. 1. Ls-rRNA 5' terminal nucleotide sequence of *Rohdea japonica* and a comparison with those from five other angiosperm species (Qu et al. 1988; Kiss et al. 1989) and an algal species (*Porphyridium purpureum*) (Perasso et al. 1989). Only nucleotides different from those in *R. japonica* are indicated. stars: deletion; X: undetermined; R=*Rohdea* (万年青属); O=*Oryza* (水稻属); Z=*Zea* (玉米属); L=*Lycopersicon* (番茄属); N=*Nicotiana* (烟草属) B=*Brassica* (芸苔属); P=*Porphyridium* (紫球藻属)

R.japonica	XXCGACCCCA	GGUCAGGCGG	GGCCACCCGC	UGAGCUUAAG	CAUAUCAUA	AGCGGAGGAG	60
O.sativa	CG-----	-----	-A-U-----	---U-----	-----A---	-----	
Z.mays	XX-----	-----U--	-A-U-----	---U-----	-----A---	-----	
L.esculentum	XG-----	-----	-AUU-----	---U-----	-----	-----A	
N.tabacum	XX-----	-----*	-A-U-----	---U-----	-----	-----A	
B.napus	XX-----	-----*	-AU-----	---U-----	-----	-----A	
P.purpureum	XX-----U--	-A-----AA	-A-U-----	---AU-----	-----A-C-	-----A	
R.japonica	AAGAAACUUA	CCAGGAUUC	CCUAGUAACG	GCGAGCGAAC	CGGGAAGAGC	CCAGCUUGGG	120
O.sativa	-----G-	-G-----	-----	---CU-----	-----GAU--	-----A-	
Z.mays	-----U	-G-----	-----	---CU-----	-----GC--	-----A-	
L.esculentum	-----G-	-A-----	-----	-----	-----C--	-----C-UA-	
N.tabacum	-----G-U	-A-----	-----	---CU-----	-----C--	-----C-UA-	
B.napus	-----AG-U	-A-----	-U-----	---CU-----	-----	-----AA	
P.purpureum	-----CC-G-C	-A-----	-C-----G-	-----G-	-----	U--AUG--A	
R.japonica	AAUCGGGCGG	***UGCGCGC	CGAAUUGUAG	UCUGGAGAAG	CGUCCUCAGC	GACGGACCGG	180
O.sativa	-----G-	CGGC---U-	-----	-----G-	-----	-----	
Z.mays	-----U	***C-----	-----	-----G-	-----	-----	
L.esculentum	-----G-	CUCC-U--U-	-----	-----	-----	-G-----	
N.tabacum	-----G-U	C**C-----UU	-----	-----	-----	-G-----	
B.napus	-----AG-U	CUUC-G--UU	-----	-----	-----	-----	
P.purpureum	---CC-G-C	GCGCGG-C-	---GA---A	---AU---G-	---CUU---U-G	-C---CG---	
R.japonica	GCCCAAGUUC	UCUGGAAAGG	GGCGCCAGGG	AGGUGAGAG	CCCCGUCCGG	CCCGGGCCCU	240
O.sativa	-----C-	C--A-----	-----U--	-----	-----	-----A---	
Z.mays	-----U	-----	-A---U--	-----	-----	-----A---	
L.esculentum	-----*	C---*-----	-----G-A-	-----	-----GU-	-----A---	
N.tabacum	-----C-	C-----G-	-----A-	-----	-----UGU-	-----	
B.napus	-----C-	C-----	-----A-	-----	-----GU-	-----A---	
P.purpureum	-UA-----C-	C--U---C-	---U-UA-	-----C-A	-----A-AU	GA--C-G-GC	
R.japonica	GCCGCACCAC	GAGGCGCUGU	CGGCGAGUCG	GGUUGUUUGG	GAAUGCAGCC	CGAAUCGGGC	300
O.sativa	-U---C---	-----C-	-AA-----	-----	-----	-A-----	
Z.mays	-U-----	---G--C-	-AA-----	-----	-----	-----	
L.esculentum	-U-----	-----	-UA-----	-----	-----	-A-----	
N.tabacum	-U-----	---G-----	-UA-----	-----	-----	-----	
B.napus	-U-----	-----	-UA-----	-----	-----	-----	
P.purpureum	-G---UGU--	-----G-C-	-----	---C---A	-----	---GU---U	
R.japonica	GGUAAAUUC	GUCCAAGGCU	AAAUAGCGGC	GAGAGACCGA	UAGCGAACAA	GU	360
O.sativa	-----C---	-----	---CA---	-----	-----	---	
Z.mays	-----C---	-----	---CA---	-----	-----	---	
L.esculentum	---G-----	-----	---CU---	-----	-----	---	
N.tabacum	---G-----	-----	---CG---	-----	-----	---	
B.napus	-----	-----	---UG---	-----	-----	---	
P.purpureum	---G-C---	A--U-A---	---CU---	-G-----	-----	---	

图1 (Fig. 1)

序列与其它几种被子植物以及一种红藻已发表的序列进行了比较分析。从图 1 可以看到, 由于被子植物间的同源性高达 90% 以上, 植物与红藻的同源序列也超过 75%, 所以全部序列的排列是准确无误的。表 1 为 rRNA 序列比较得到的差异矩阵。我们以表 1 中的数值为基础构建了一个分子树系图(图 2)。

表 1 rRNA 序列矩阵*

Table 1 A matrix of differences among seven groups in rRNA 5' terminal nucleotide sequences.

	R.j	O.s	Z.m	L.e	N.t	B.n	P.p
R. japonica		29	24	28	31	28	81
O. sativa	0.090		12	26	30	31	86
Z. mays	0.074	0.036		28	26	28	86
L. esculentum	0.087	0.080	0.087		16	21	86
N. tabacum	0.097	0.093	0.081	0.048		18	84
B. napus	0.087	0.096	0.087	0.064	0.055		84
P. purpureum	0.286	0.308	0.308	0.307	0.297	0.299	

* 右上方为不同类群间的核苷酸差异数;左下方是经过 Kimura 公式校正后得到的 Knuc 值。
In the right upper triangle are the numbers of differences and in the opposite one are the Knuc values calibrated using Kimura's formula.

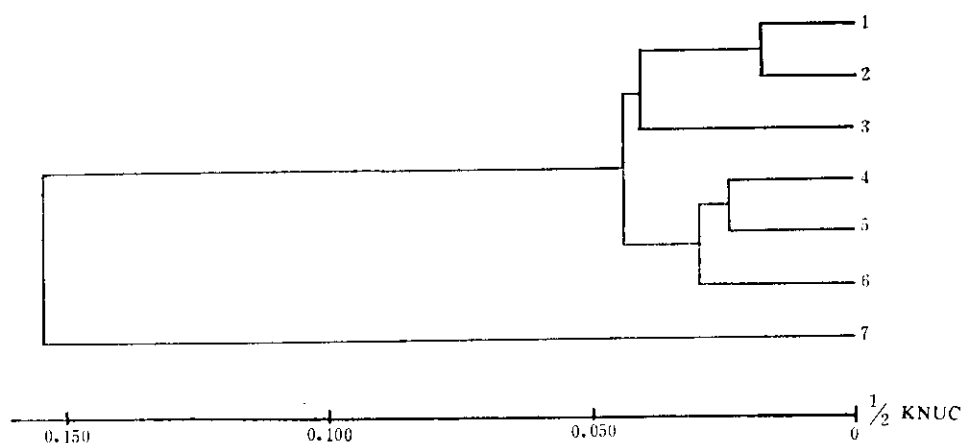


图 2 rRNA 树系图。用表 1 中的 Knuc 值和简单聚类法 (UPGMA) 构建。

Fig. 2 A rRNA dendrogram constructed using UPGMA method and based on Knuc values presented in Table 1.

1. *Oryza sativa*; 2. *Zea mays*; 3. *Rohdea japonica*; 4. *Lycopersicon esculentum*; 5. *Nicotiana tabacum*; 6. *Brassica napus*; 7. *Porphyridium purpureum*.

2. 在我们的树系图中,禾本科的玉米,水稻及茄科的番茄和烟草分别为两组距离最小的植物群,不同科的植物间进化距离则相应较大。单子叶植物和双子叶植物明显分为两大类群,各自处于独立的分枝上,而红藻与被子植物则显示出很大的进化距离。这说明我们的 rRNA 系统树与一般接受的植物分类系统十分吻合。同时,以 Ls-rRNA 5' 端作为揭示植物不同科、属间的差异的分子指标有良好的分辨率。

3. 万年青与禾本科植物的差异很大, 这两类单子叶植物的分歧很可能发生在单子叶植物起源的早期。从树系图上来看, 它们分歧的年代甚至接近于单子叶和双子叶植物分歧的时期。我们这一结论, 与百合科(广义)被认为是较原始的单子叶植物的看法是一致的 (Dahlgren et al. 1985)。

讨 论

以 Ls-rRNA 5' 端 340 多个核苷酸作为系统和进化的分子指标, 比常用的小分子 RNA 分子指标如 5S rRNA (120 个核苷酸), 叶绿体 4.5S rRNA (96—103 个核苷酸) 包含更多的进化信息, 这对于研究一些亲缘关系较近的生物类群将具有重要的意义。例如, 5S rRNA 序列虽然能够揭示出一些被子植物类群间的分子差异, 但是以 5S rRNA 建立的被子植物树系图 (Hori and Osawa 1987), 其分辨率很差, 其结论显然需要得到其它分子数据的进一步证实。

根据我们过去研究的结果 (Qu et al. 1988), 用 Ls-rRNA 部分序列作为分子指标, 其结果与采用整个 Ls-rRNA 分子所得到的结果基本上一致, 只是在分析的精确度上有一定的差别。所以我们认为 Ls-rRNA 5' 端 340 多个核苷酸可以作为一个比小分子 rRNA 更加有效的分子指标用于高等植物的系统和进化研究。

参 考 文 献

- [1] Auffray, C. and F. Rougeon, 1980: Purification of mouse immunoglobulin heavy-chain mRNAs from total myeloma tumor RNA. *Eur. J. Biochem.* 107: 303—314.
- [2] Dahlgren, R. M. T., H. T. Clifford and P. F. Yeo, 1985: The Families of the Monocotyledons: Structure, Evolution and Taxonomy. Springer-Verlag, Berlin.
- [3] Hori, H. and S. Osawa, 1987: Origin and evolution of organisms as deduced from 5S rRNA sequences. *Mol. Biol. Evol.* 4: 445—472.
- [4] Kimura, M., 1980: A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions. *J. Mol. Evol.* 16: 111—120.
- [5] Kiss, T., M. Kis and F. Solymosy, 1989: Nucleotide sequence of a 25S rRNA gene from tomato. *Nucleic Acids Res.* 17: 796.
- [6] Pace, N. R., G. J. Olsen and C. R. Woese, 1986: Ribosomal RNA phylogeny and the primary lines of evolutionary descent. *Cell* 45: 325—326.
- [7] Perasso, R., A. Baroin, L. H. Qu, J. P. Bachellerie and A. Adoutte, 1989: Origin of the algae. *Nature* 339: 142—144.
- [8] Qu, L. H., B. Michot and J. P. Bachellerie, 1983: Improved methods for structure probing in large RNAs: a rapid 'heterologous' sequencing approach is coupled to the direct mapping of nuclease-accessible sites. Application to the 5' terminal domain of eukaryotic 28S rRNA. *Nucleic Acids Res.* 11: 5903—5920.
- [9] Qu, L. H., M. Nicoloso and J. P. Bachellerie, 1988: Phylogenetic calibration of the 5' terminal domain of large rRNA achieved by determining twenty eucaryotic sequences. *J. Mol. Evol.* 28: 113—124.
- [10] Sneath, P. H. A. and R. R. Sokal, 1973: Numerical taxonomy W. H. Freeman and Company, San Francisco.